

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/050057

International filing date: 07 January 2005 (07.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: PL
Number: P-364348
Filing date: 12 January 2004 (12.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 March 2005 (09.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ



ZAŚWIADCZENIE

PHARMENA Sp. z o.o.

Łódź, Polska

złożyła w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej dnia 12 stycznia 2004 r. podanie o udzielenie patentu na wynalazek pt.: „Zastosowanie czwartorzędowych soli pirydyniowych jako środka naczynioprotekcyjnego.”

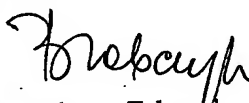
Dołączone do niniejszego zaświadczenia opis wynalazku, zastrzeżenia patentowe i rysunki są wierną kopią dokumentów złożonych przy podaniu w dniu 12 stycznia 2004 r.

Podanie złożono za numerem **P-364348**

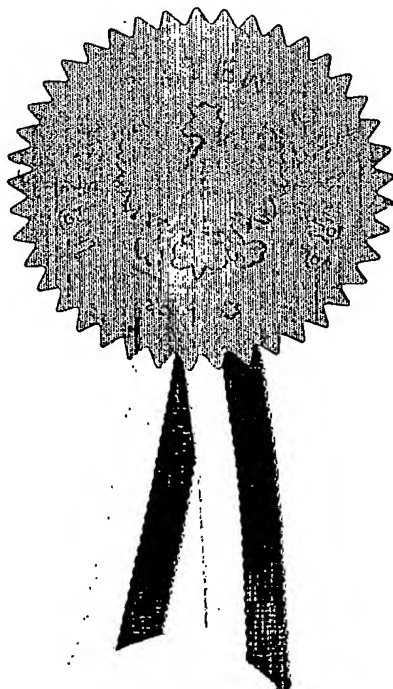
EP/05/50057

Warszawa, dnia 08 grudnia 2004 r.

z upoważnienia Prezesa


inż. Barbara Zabczyk

Naczelnik



63417/JS

5

10 Zastosowanie czwartorzędowych soli pirydyniowych jako środka naczynioprotekcyjnego

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pewnych czwartorzędowych soli pirydyniowych do wytwarzania środka naczynioprotekcyjnego do leczenia i/lub profilaktyki stanów lub chorób związanych z dysfunkcją 15 śródbłonna naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂), oraz zastosowanie soli pirydyniowych do stosowania doustnego w suplementacji diety.

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że dysfunkcja śródbłonna odgrywa kluczową rolę w powstawaniu i rozwoju blaszki miażdżycowej. W 20 świetle dzisiejszego stanu wiedzy dysfunkcja śródbłonna ma znaczenie diagnostyczne, rokownicze i terapeutyczne (Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678; Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899-1906; 25 Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001;104:191-196; Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr., Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000;101:948-954). Klinicznie, dysfunkcja śródbłonna jest utożsamiana z 30

upośledzeniem aktywności biologicznej NO, którą ocenia się jako upośledzenie naczyniorozszerzającej aktywności NO. Upośledzenie aktywności biologicznej NO współlistnieje ze stresem oksydacyjnym (Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:2673-2678) i upośledzoną produkcją śródbłonkowej PGI₂ (Kyrle PA, Minar E, Brenner B, Eichler HG, Heisteringer M, Marosi L, Lechner K. Thromboxane A₂ and prostacyclin generation in the microvasculature of patients with atherosclerosis - effect of low-dose aspirin. *Thromb Haemost* 1989;61:374-377), choć poziom PGI₂ może być podwyższony. Istotnie, wiele lat temu zaproponowano, że nadtliski lipidów mogą promować rozwój miażdżycy przez selektywne upośledzenie śródbłonkowej syntezy PGI₂ i następową aktywację płytek krwi (Gryglewski RJ. Prostacyclin and atherosclerosis. *TIPS* 1980;1:164-168; Gryglewski RJ. Prostaglandins, platelets, and atherosclerosis. *CRC Crit Rev Biochem* 1980;7:291-338; Gryglewski RJ, Szczeklik A. Prostacyclin and atherosclerosis - experimental and clinical approach. 1983;213-226). Ta hipoteza została poparta dowodami doświadczalnymi. Dzisiaj istnieje już wiele dowodów na to, że upośledzenie śródbłonkowej syntezy PGI₂ może prowadzić do nadmiernej stymulacji receptorów TP w śródbłonku i w mięśniówce gładkiej przez TXA₂, PGH₂ albo przez inne eikozanoidy. Te mechanizmy doprowadzają do nadmiernego skurczu naczyń krwionośnych, aktywacji płytek krwi, aktywacji zapalnej śródbłonka i apoptozy śródbłonka. Oznacza to, że upośledzenie śródbłonkowej syntezy PGI₂ może wyzwać lub nasilać procesy zapalne i zakrzepowe w ścianie naczynia – te uważa się dzisiaj za kluczowe w rozwoju miażdżycy (*atherothrombosis*). Zgodnie z tym, można sądzić że zdolność niektórych czwartorzędowych soli pirydyniowych do stymulacji produkcji PGI₂ w śródbłonku może przynosić skutki przeciwmiażdżycowe. Podobnie, w wielu innych chorobach (wyżej wymienionych), w których dysfunkcja śródbłonka odgrywa rolę w ich patogenezie, farmakologiczne zwiększenie produkcji PGI₂ przez śródbłonek pod wpływem tych soli może przynosić skutki terapeutyczne. Podsumowując, uważamy że sole te mają potencjał terapeutyczny we wszystkich

chorobach, w których odgrywają rolę dysfunkcja śródbłonna, stres oksydacyjny i niewydolność śródbłonkowej syntezy PGI₂.

W publikacji międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr WO 00/40559 ujawniono zastosowanie terapeutyczne i kosmetyczne pochodnych nikotynamidu, 1,3-dipodstawionych soli pirydyniowych, w tym soli 1-metylonikotynamidu, (MNA⁺) i 1-metylo-N'-(hydroksymetylo)nikotynamidu (MNAF⁺). Podano, że związki te znajdują zastosowanie do miejscowego leczenia chorób skóry, w szczególności owrzodzenia podudzi, trądzika, łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, bielactwa, a także oparzeń, oraz w gojeniu ran. Związki te wykazują także działanie pobudzające odrastanie włosów, są więc skuteczne w leczeniu różnego typu łysienia. Opisano różnego typu preparaty do miejscowego podawania tych związków na skórę lub na powierzchnie błony śluzowej, w tym szampony, maści, kremy, żele, lotiony, roztwory, spreje, etc., a także do podawania doustnego w leczeniu chorób skóry. Opisano również działanie kosmetyczne tych związków, w szczególności działanie regenerujące i wygładzające skórę.

Działanie chlorku 1-metylonikotynamidu w chorobach skóry opisano również w publikacji (Gębicki J, Sysa-Jędrzejowska A, Adamus J, Woźniacka A, Rybak M, Zielonka J. 1-Methylnicotinamide: a potent anti-inflammatory agent of vitamin origin. *Pol J Pharmacol* 2003;55:109-112) i zaproponowano, że związek ten ma działanie przeciwzapalne, nie wyjaśniono jednak mechanizmu takiego działania.

Sól 1-metylo-3-acetylopirydyniową (MAP⁺), opisano w publikacji (Takashi Sakurai, Haruo Hosoya. Charge transfer complexes of nicotinamide-adenine dinucleotide analogs and flavine mononucleotide. *Biochim. Biophys. Acta* 1966;112(3):359-468).

Obecnie okazało się, że MAP⁺ oraz niektóre ze związków opisanych w WO 00/40559, a mianowicie MNA⁺ i MNAF⁺ mają unikatowe własności farmakologiczne związane z ich zdolnością do uwalniania endogennej prostacykliny (PGI₂) ze śródbłonna, która to własność odróżnia je od zbliżonych do nich w budowie chemicznej nikotynamidu, kwasu nikotynowego, trygoneliny i endogennych metabolitów MNA⁺: amidu kwasu 1-metylo-2-pirydono-5-karboksylowego (2-PYR) i amidu kwasu 1-metylo-4-pirydono-3-karboksylowego (4-PYR). Zgodnie z tym powyższe związki, a w szczegól-

ności MNA⁺, mogą być skuteczne w profilaktyce lub leczeniu ludzi cierpiących na choroby związane z dysfunkcją śródbłónka, zwiększonym stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂) lub z podwyższonym ryzykiem zachorowalności na takie choroby.

5 Opis figur rysunku

Fig. 1. Schemat techniki badania działania trombolitycznego leków *in vivo* wg. Gryglewskiego.

Fig. 2. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylną podanie MNA⁺ (30 mg/kg).

10 Fig. 3. Zmiany poziomu 6-keto-PGF_{1α} (•) i TXB₂ (◦) w osoczu po dożylnym podaniu MNA⁺ (30 mg/kg).

Fig. 4. Brak znaczącej odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* po dożylnym podaniu nikotynamidu (30 mg/kg) lub kwasu nikotynowego (30 mg/kg).

15 Fig. 5. Brak znaczącej odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* po dożylnym podaniu 2-PYR (30 mg/kg) lub trygoneliny (30 mg/kg).

Fig. 6. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylną podanie MAP⁺ (30 mg/kg).

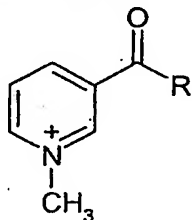
20 Fig. 7. Zmiany poziomu 6-keto-PGF_{1α} (•) i TXB₂ (◦) w osoczu po dożylnym podaniu MAP⁺ (30 mg/kg).

Fig. 8. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylną podanie MNAF⁺ (30 mg/kg).

Fig. 9. Brak wpływu MNA⁺ na agregację płytek krwi wywołaną przez kolagen (1 mg/ml).

25 Fig. 10 Brak wpływu MNA⁺ na aktywację neutrofili wywołaną przez lateks.

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest zastosowanie czwartorzędowych soli pirydyniowych o wzorze I:



X⁻

I

w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny farmaceutycznie przeciwjon,
do wytwarzania środka naczynioprotekcyjnego do leczenia i/lub profilaktyki stanów lub chorób związanych z dysfunkcją śródbłónka naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI_2).

Szczególnie korzystnym działaniem związków zgodnie z obecną wiedzą jest ich działanie śródbłonkowe związane z uwolnieniem PGI_2 skutkiem czego związki te mogą poprawiać perfuzję tkankową, działać przeciwzakrzepowo, trombolitycznie, przeciwapoptotycznie, przeciwmiażdżycowo, oraz działać ochronne na śluzówkę żołądka i przewodu pokarmowego.

Zaletę wynalazku stanowi fakt, że działaniu trombolitycznemu związków nie towarzyszy działanie hipotensyjne. Ponadto, to działanie trombolityczne nie jest związane z bezpośrednim działaniem na płytki krwi. Związki te nie działają również bezpośrednio na aktywność leukocytów.

W jednym wariantcie wynalazku, stanem lub chorobą jest miażdżyca tętnic (*atherothrombosis*) dotycząca jakiegokolwiek łóżyska naczyniowego np. stabilna choroba wieńcowa, niedokrwienne epizody mózgowe lub choroba Buergera.

W innym wariantcie wynalazku, stanem lub chorobą jest epizod sercowo-naczyniowy na podłożu miażdżycy tętnic, w szczególności śmierć sercowa, ostry zespół wieńcowy (w tym niestabilna choroba niedokrwien na serca, zawał serca), konieczność angioplastyki wieńcowej (PCI), pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), udar niedokrwienno mózgu, konieczność rewaskularyzacji krążenia obwodowego.

W jeszcze innym wariantcie wynalazku, stan lub choroba jest wybrany z grupy tzw. ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic (*atherothrombosis*) składającej się z następujących: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinemia, oporność na insulinę, cukrzyca, menopauza, podeszły wiek, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów,

miażdżycy naczyń przeszczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

W jeszcze innym wariantcie wynalazku, stanem lub chorobą jest zakrzepica o innym podłożu niż miażdżycy tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i powlekanych protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializą, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

W jeszcze innym wariantcie wynalazku, stan lub choroba związane z dysfunkcją śródbłonna są wybrane z grupy składającej się z następujących: przewlekła niewydolność serca, nadciśnienie płucne, powikłania mikronaczyniowe cukrzycy, neuropatia cukrzycowa, zespół nerczycowy, przewlekła niewydolność nerek, zespół ostrej niewydolności oddechowej typu dorosłych (ARDS), mukowiscydoza, astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD), stan przedrzucawkowy - rzucawka, zaburzenia wzrodu, zespół Steina-Leventhala, zespół bezdechu śródsennego, toczeń rumieniowaty układowy, anemia sierpowata, nieswoiste zapalne choroby jelit, choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy, jaskra, pierwotna amyloidoz, choroby neurodegeneracyjne, w szczególności choroba neurodegeneracyjna wybrana z otępienia naczyniopochodnego, choroby Alzheimera i choroba Parkinsona.

Korzystne jest zastosowanie związków według wynalazku do leczenia i profilaktyki choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy.

Jak wskazano powyżej, X^- jest dowolnym fizjologicznie odpowiednim przeciwjonem. Tak więc związki o wzorze (I) mogą być pochodnymi każdego fizjologicznie akceptowanego kwasu, tak organicznego jak i nieorganicznego. Odpowiednie sole kwasów nieorganicznych to, na przykład, chlorek, bromek, jodek i węglan; odpowiednimi solami kwasów organicznych mogą być sole kwasów mono- di- i tri- C_{1-18} -karboksylowych, na przykład: octan, benzoesan, salicylan, hydroksyoctan, mleczan, malonian i cytrynian. Korzystnie sole mogą być chlorkami, benzoesanami, salicylanami, octanami, cytrynianami i mleczanami; specjalnie korzystnie chlorkami.

Szczególnymi związkami o wzorze (I) są sole 1-metylonikotynamidu (MNA⁺), sole 1-metylo-3-acetylopirydyniowe (MAP⁺) i sole 1-metylo-N'-(hydroksymetylo)nikotynamidu (MNAF⁺).

Przedmiotem wynalazku w następnym aspekcie jest sposób leczenia
 5 i/lub profilaktyki stanów lub chorób związanych z dysfunkcją śródbłónka
 naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłónkowej
 syntezy prostacykliny (PGI₂), w szczególności takich jak opisano powyżej,
 obejmujący podawanie osobie wymagającej takiego postępowania, sku-
 tecznej terapeutycznie ilości pochodnej pirydyniowej o wzorze I takim jak
 10 zdefiniowano powyżej.

Czwartorzędowe sole pirydyniowe o wzorze I mogą być podawane w
 połączeniu z innym środkiem o działaniu sercowo-naczyniowym.

Sole pirydyniowe o wzorze I mogą być podawane w szczególności
 drogą doustną, w postaci typowych, doustnych form dawkowania takich
 15 jak tabletki, kapsułki, roztwory/zawiesiny doustne w dopuszczalnym far-
 maceutycznie nośniku ciekłym, wytworzonych znanymi sposobami i za-
 wierających znane składniki nieczynne lub nośniki.

Sole pirydyniowe mogą być podawane w szczególności drogą pozaje-
 litową, w formie wstrzyknień, w tym wstrzyknień podskórnych, dożylnych,
 20 oraz wlewów.

Inne możliwe drogi podawania soli pirydyniowych o wzorze I to dro-
 ga wziewna, donosowa i doodbytnicza.

Dobowe dawki soli pirydyniowych o wzorze I mogą być zawarte w
 zakresie 10 do 1000 mg i mogą być podawane w dawkach pojedynczych
 25 lub podzielonych.

W jednym wariantcie sposobu leczenia według wynalazku, stanem
 lub chorobą jest miażdżycza tętnic (*atherothrombosis*) dotycząca jakiego-
 kolwiek łożyska naczyniowego np. stabilna choroba wieńcowa, niedo-
 krwienne epizody mózgowe lub choroba Buergera.

30 W innym wariantcie sposobu leczenia według wynalazku, stanem
 lub chorobą jest epizod sercowo-naczyniowy na podłożu miażdżycy tętnic,
 w szczególności śmierć sercowa, ostry zespół wieńcowy (w tym niestabilna
 choroba niedokrwienna serca, zawał serca), konieczność angioplastyki

wieńcowej (PCI), pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), udar niedokrwienny mózgu, konieczność rewaskularyzacji krążenia obwodowego.

W jeszcze innym wariantcie sposobu leczenia według wynalazku, stan lub choroba jest wybrany z grupy tzw. czynnika ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic (*atherothrombosis*) składającej się z następujących: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinemia, oporność na insulinę, cukrzyca, menopauza, podeszły wiek, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżycy naczyń przeszczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

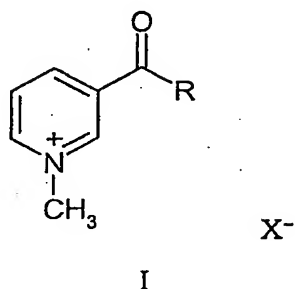
W jeszcze innym wariantcie sposobu leczenia według wynalazku, stanem lub chorobą jest zakrzepica o innym podłożu niż miażdżycy tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i powlekanych protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializą, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

W jeszcze innym wariantcie sposobu leczenia według wynalazku, stan lub choroba związane z dysfunkcją śródbłonna są wybrane z grupy składającej się z następujących: przewlekła niewydolność serca, nadciśnienie płucne, powikłania mikronaczyniowe cukrzycy, neuropatia cukrzycowa, zespół nerczycowy, przewlekła niewydolność nerek, zespół ostrej niewydolności oddechowej typu dorosłych (ARDS), mukowiscydoza, astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD), stan przedrzucawkowy - rzucawka, zaburzenia wzrodu, zespół Steina-Leventhala, zespół bezdechu śródsennego, toczeń rumieniowaty układowy, anemia sierpowata, nieswoiste zapalne choroby jelit, choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy, jaskra, pierwotna amyloidoz, choroby neurodegeneracyjne, w szczególności choroba neurodegeneracyjna wybrana z otępienia naczyniopochodnego, choroby Alzheimera i choroba Parkinsona.

Korzystne jest zastosowanie związków o wzorze I określonym powyżej w sposobie leczenia i profilaktyki choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób zwiększania poziomu prostacykliny u ssaków, polegający na doustnym podawaniu skutecznej ilości soli pirydyniowej o wzorze I zdefiniowanym powyżej.

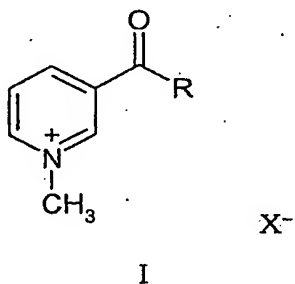
Wynalazek niniejszy dostarcza ponadto soli pirydyniowych o wzorze I:



- 5 w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny do spożycia przeciwjon, do stosowania doustnego w suplementacji diety.

10 Sole pirydyniowe o wzorze I stosowane jako doustny suplement diety, zwiększają poziom prostacykliny, dzięki czemu działają naczynioochronnie.

Wynalazek niniejszy dostarcza ponadto zastosowania soli pirydyniowych o wzorze I:



- 15 w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny do spożycia przeciwjon, do wytwarzania środka przeznaczenia żywieniowego do ochrony naczyń krwionośnych u ssaków w stanach lub chorobach związanych z dysfunkcją śródbłónka naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂).
- 20

Stanem lub chorobą, w których może być podawany środek żywieniowy jest miażdżycza tętnic, w szczególności u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, niedokrwieniami epizodami mózgowymi lub chorobą Buergera.

- 25 Stan lub choroba, w których może być podawany środek żywieniowy, może być wybrany z grupy składającej się z następujących: hipercho-

lesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinaemia, oporność na insulinę, cukrzyca, menopauza, zmniejszenie syntezy prostacykliny związane z wiekiem, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca naczyń przeszczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

Stanem lub chorobą, w których może być podawany środek żywieniowy jest również zakrzepica o innym podłożu niż miażdżyca tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i powlekanych protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializą, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

Szczególnymi solami pirydyniowymi o wzorze I do stosowania w suplementacji diety i/lub jako środek żywieniowy są związki, w których R oznacza grupę CH_3 .

Szczególnymi solami pirydyniowymi o wzorze I do stosowania w suplementacji diety i/lub jako środek żywieniowy są związki, w których R oznacza grupę NH_2 .

Szczególnymi solami pirydyniowymi o wzorze I do stosowania w suplementacji diety i/lub jako środek żywieniowy są związki, w których R oznacza grupę $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$.

Środki do suplementacji diety i środki żywieniowe mają postać odpowiednią do podawania doustnego, taką jak tabletki, kapsułki, roztwory i zawiesiny do picia, i tym podobne, typowa i znana w technice farmaceutycznej i wytworzona zgodnie ze znanymi technikami i z zastosowaniem typowych nośników i substancji pomocniczych.

Korzystnie środek do suplementacji diety lub środek żywieniowy może zawierać co najmniej 5% wagowych soli pirydyniowej o wzorze I.

Poniżej podano przykłady ilustrujące działanie farmakologiczne soli pirydyniowych.

Aktywność trombolityczną badano metodą opisaną przez Gryglewskiego i współpr., (Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A, Stachura J. In vivo method for quantitation for anti-platelet potency of drugs. *Naunyn*

Schmiedebergs Arch Pharmacol 1978;302:25-30), przedstawioną schematycznie na Fig. 1.

Szczury, wagi około 300-350 g, w znieczuleniu ogólnym (tiopental 95 mg/kg i.p.), po wstępnej heparynizacji (800 jed./kg i.v.) są kaniulowane. Kaniule umieszczone w tętnicach są podłączone: z lewej tętnicy szyjnej do czujnika ciśnienia; z prawej tętnicy szyjnej przez ogrzewany (37°C) przewód do pompy perystaltycznej, która przetacza krew tętniczą do krążenia pozaustrojowego, gdzie omywa ona (1.5 ml/min) pasek kolagenu o długości 3 cm zawieszony na dźwigni auktotonicznej izotonicznego prze-
 10 kaźnika (Harvard 386) zaopatrzonego w sprężynowy amortyzator. Pasek kolagenowy jest wycięty ze ścięgna Achillesa królika. Po omyciu paska krew powraca poprzez zbiorniczek kompensacyjny połączony z lewą żyłą udową do krążenia zwierzęcia. W czasie superfuzji paska kolagenu na jego powierzchni tworzy się zakrzep zbudowany z agregatów płytek krwi uwię-
 15 zionych w sieci włókniaka (mikroskopowo uwidocznionej metodą Weigerta).

Po 20-30 minutach superfuzji krwią paska kolagenu waga zakrzepu (nieustannie monitorowana) stabilizuje się na poziomie 70-100 mg i na tym *plateau* pozostaje do końca doświadczenia, to znaczy przez 3-5 godzin o ile eksperymentator nie wstrzyknie dożylnie zwierzęciu aktywnego leku.
 20 Jeśli lek działa trombolitycznie to następuje spadek wagi zakrzepu. Ciśnienie tętnicze i waga zakrzepu są nieustannie równolegle rejestrowane. Ten układ pozwala więc na badanie działania trombolitycznego i hipotensyjnego działania leku (Fig. 1).

Analiza odpowiedzi trombolitycznej w tym układzie doświadczalnym
 25 była uzupełniana przez pomiar poziomu 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂ i PGE₂ w osoczu krwi tętniczej. W tym celu próbki krwi (500 µl) były pobierane do eppendorfek z indometacyną i EDTA (stężenia końcowe odpowiednio- 10 µM, 1 mM). Następnie próbki krwi były wirowane przez 5 minut (2.000 x g) i przetrzymywane (-70°C) do oznaczenia. Poziomy prostanoidów ozna-
 30 czano stosując dostępne komercyjnie kity ELISA (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI).

Dożylne podanie MNA⁺ (3 - 30 mg/kg) wywoływało zależną od dawki odpowiedź trombolityczną u szczurów rasy Wistar z krążeniem pozaustrojowym. Maksymalną odpowiedź trombolityczną obserwowano przy dawce

30 mg/kg. Po jednorazowym wstrzyknięciu 30 mg/kg MNA⁺ odpowiedź trombolityczna była długotrwała, osiągała swoje plateau na poziomie $42 \pm 4 \%$ już około 30 min po wstrzyknięciu i pozostawała na podobnym poziomie przez 2-3 godziny doświadczenia. W przeciwieństwie do MNA⁺, ani
 5 nikotynamid ani kwas nikotynowy ani trygonelina, ani też 2-PYR - endogenne metabolit MNA⁺, (każdy w dawce do 30 mg/kg) nie wywoływał znaczącej odpowiedzi trombolitycznej. Odpowiedzi trombolityczne wywołane przez nikotynamid, lub kwas nikotynowy były krótkotrwałe (krótsze niż 15-20 minut) i ich maksimum wynosiło odpowiednio zaledwie $9 \pm 0,6 \%$ i
 10 $5 \pm 0,9 \%$. Trygonelina nie wywoływała żadnej odpowiedzi, a odpowiedź wywołana przez 2-PYR była również niewielka ($<10 \%$) i przejściowa (krócej niż 15 min). Zdolność do wywołania odpowiedzi trombolitycznej przez MNA⁺, nikotynamid i kwas nikotynowy korelowała z uwalnianiem 6-keto-PGF_{1α} do krwi przez te związki. Wstrzyknięcie MNA⁺ (30 mg/kg) wywoły-
 15 wało znaczący wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α} już po 15 minutach (z poziomu 104 ± 7 do 460 ± 58 pg/ml) który utrzymywał się na podobnym poziomie (około 400 pg/ml) co najmniej przez godzinę. Z drugiej strony ani poziom TXB₂ ani poziom PGE₂ nie zmieniały się znacząco pod wpływem MNA⁺. Niewielki zależny od czasu doświadczenia wzrost TXB₂ obserwowano również po wstrzyknięciu soli fizjologicznej. Poziom 6-keto-PGF_{1α} nie
 20 zwiększał się po wstrzyknięciu nikotynamidu lub kwasu nikotynowego (oba związki w dawce 30 mg/kg).

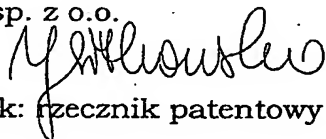
W obecności indometacyny (5 mg/kg) odpowiedź trombolityczna wywołana przez MNA⁺ była zniesiona jak również wywołany przez MNA⁺
 25 wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α}. Należy dodać, że odpowiedź trombolityczna wywołana przez MNA⁺ (30 mg/kg) nie była związana ze spadkiem ciśnienia tętniczego krwi. *In vitro*, agregacja płytek krwi w PRP nie była hamowana przez MNA⁺ nawet w stężeniu 10 mM co wyklucza możliwość że działanie trombolityczne MNA⁺ obserwowane *in vivo* wynika z bezpośred-
 30 niego działania MNA⁺ na płytki krwi. MNA⁺ (1 mM) pozbawione jest również działania hamującego aktywność neutrofili aktywowanych przez lateks co podkreśla jego selektywność śródbłonkową.

Na Fig. 2 przedstawiono zapisy odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez MNA⁺ (30 mg/kg), a na Fig. 3 towarzyszący temu działa-

niu wzrost poziomu 6-keto-PGF_{1α} – stabilnego metabolitu PGI₂. Nikotynamid, kwas nikotynowy (Fig. 4), trygonelina i 2-PYR (Fig. 5) w tej dawce a nawet w wyższej wykazywały bardzo słabe działanie trombolityczne. Działanie trombolityczne tylko niewiele słabsze od MNA⁺ wykazywały MAP⁺ i MNAF⁺ (30 mg/kg) (Fig. 6 i Fig. 8). Działanie trombolityczne MAP⁺, podobnie jak w przypadku MNA⁺ związane było z uwolnieniem PGI₂ (Fig. 7). MNA⁺ (30 – 300 mg/kg) nie ma działania hipotensyjnego. Fig. 9 i Fig. 10 przedstawiają odpowiednio brak bezpośredniego działania MNA⁺ na aktywację płytek krwi i aktywację neutrofili. Agregacja płytek krwi wywołana przez kolagen zależy od aktywacji szlaku COX-1 - TXA₂ i była znoszona przez aspirynę, a wzrost chemiluminescencji neutrofili aktywowanych przez lateks zależy od aktywacji NADPH oksydazy i był hamowany przez DPI i apocyninę.

15

Pharmena sp. z o.o.



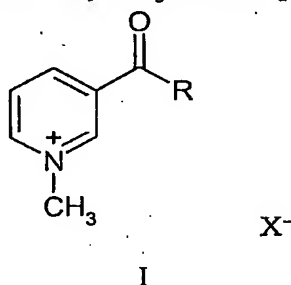
Pełnomocnik: rzecznik patentowy Jadwiga Sitkowska

5

Zastrzeżenia patentowe

10

1. Zastosowanie czwartorzędowych soli pirydyniowych o wzorze I:



15 w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny farmaceutycznie przeciwjon,
do wytwarzania środka naczynioprotekcyjnego do leczenia i/lub profilaktyki w stanach lub chorobach związanych z dysfunkcją śródbłonnka naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI_2).

20 2. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stanem lub chorobą jest miażdżyca tętnic.

3. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stanem lub chorobą jest epizod sercowo-naczyniowy na podłożu miażdżycy tętnic, w szczególności śmierć sercowa, ostry zespół wieńcowy (w tym niestabilna choroba
25 niedokrwienność serca, zawał serca), konieczność angioplastyki wieńcowej (PCI), pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), udar niedokrwienności mózgu, konieczność rewaskularyzacji krążenia obwodowego.

4. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stanem lub chorobą jest miażdżyca tętnic u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, niedo-
30 krwiennymi epizodami mózgowymi lub chorobą Buergera.

5. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stan lub choroba jest wybrany z grupy tzw. czynników rozwoju miażdżycy tętnic (*atherothrombosis*) składającej się z następujących: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinemia, oporność na insulinę, cukrzyca, menopauza, zmniejszenie syntezy prostacykliny związane z wiekiem, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżycy naczyń prze-
szczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

6. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stanem lub chorobą jest zakrzepica o innym podłożu niż miażdżycy tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializą, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

7. Zastosowanie według zastrz. 1, w którym stan lub choroba związane z dysfunkcją śródbłónka są wybrane z grupy składającej się z następujących: przewlekła niewydolność serca, nadciśnienie płucne, powikłania mikronaczyniowe cukrzycy, neuropatia cukrzycowa, zespół nerczycowy, przewlekła niewydolność nerek, zespół ostrej niewydolności oddechowej typu dorosłych (ARDS), mukowiscydoza, astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD), stan przedrzucawkowy - rzucawka, zaburzenia wzrodu, zespół Steina-Leventhala, zespół bezdechu śródse-
nne-
go, toczeń rumieniowaty układowy, anemia sierpowata, nieswoiste zapalne choroby jelit, choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy, jaskra, pierwotna amyloidoz, choroby neurodegeneracyjne.

8. Zastosowanie według zastrz. 7, w którym choroba neurodegeneracyjna jest wybrana z otępienia pochodzenia naczyniowego, choroby Alzheimera i choroby Parkinsona.

9. Zastosowanie według zastrz. 7, w którym stanem lub chorobą jest choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy.

10. Zastosowanie według zastrz. 1 do 9, w którym środek naczynioprotekcyjny ma postać leku do podawania doustnego.

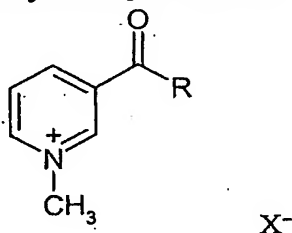
11. Zastosowanie według zastrz. 1 do 9, w którym środek naczynioprotekcyjny ma postać leku do podawania pozajelitowego.

12. Zastosowanie według zastrz. 1 do 11, w którym R oznacza grupę CH_3 .

13. Zastosowanie według zastrz. 1 do 11, w którym R oznacza grupę NH_2 .

5 14. Zastosowanie według zastrz. 1 do 11, w którym R oznacza grupę $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$.

15. Sposób leczenia i/lub profilaktyki stanów lub chorób związanych z dysfunkcją śródbłonka naczyniowego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI_2), obejmujący
10 podawanie osobie wymagającej takiego postępowania, skutecznej terapeutycznie ilości pochodnej pirydyniowej o wzorze I:



15 w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny farmaceutycznie przeciwjon.

16. Sposób według zastrz. 15, w którym stanem lub chorobą jest miażdżycy tętnic.

17. Sposób według zastrz. 15, w którym stanem lub chorobą jest epizod sercowo-naczyniowy na podłożu miażdżycy tętnic, w szczególności
20 śmierć sercowa, ostry zespół wieńcowy (w tym niestabilna choroba niedokrwienna serca, zawał serca), konieczność angioplastyki wieńcowej (PCI), pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), udar niedokrwieny mózgu, konieczność rewaskularyzacji krążenia obwodowego.

18. Sposób według zastrz. 15, w którym stanem lub chorobą jest
25 miażdżycy tętnic u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, niedokrwienymi epizodami mózgowymi lub chorobą Buergera.

19. Sposób według zastrz. 15, w którym stan lub choroba jest wybrany z grupy tzw. czynników rozwoju miażdżycy tętnic (*atherothrombosis*)
30 składającej się z następujących: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinemia, oporność na insulinę, cu-

krzyca, menopauza, zmniejszenie syntezy prostacykliny związane z wiekiem, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca naczyń przeszczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

5 20. Sposób według zastrz. 15, w którym stanem lub chorobą jest zakrzepica o innym podłożu niż miażdżyca tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i powlekanych protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializą, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

10 21. Sposób według zastrz. 15, w którym stan lub choroba są wybrane z grupy składającej się z następujących: przewlekła niewydolność serca, nadciśnienie płucne, powikłania mikronaczyniowe cukrzycy, neuropatia cukrzycowa, zespół nerczycowy, przewlekła niewydolność nerek, zespół ostrej niewydolności oddechowej typu dorosłych (ARDS), mukowiscydoza, astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc (COPD), stan przedrzucawkowy - rzucawka, zaburzenia wzrodu, zespół Steina-Leventhala, zespół bezdechu śródsennego, toczeń rumieniowaty układowy, anemia sierpowata, nieswoiste zapalne choroby jelit, choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy, jaskra, pierwotna amyloidoz, choroby neurodegeneracyjne.

22. Sposób według zastrz. 21, w którym choroba neurodegeneracyjna jest wybrana z otępienia pochodzenia naczyniowego, choroby Alzheimera i choroby Parkinsona.

23. Sposób według zastrz. 21, w którym chorobą jest choroba wrzodowa żołądka lub dwunastnicy.

24. Sposób według zastrz. 15, w którym pochodną pirydyniową podaje się doustnie.

25. Sposób według zastrz. 15, w którym pochodną pirydyniową podaje się pozajelitowo.

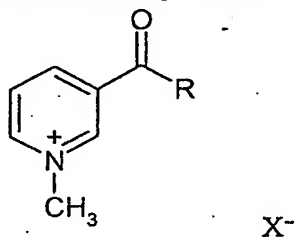
30 26. Sposób według zastrz. 15, w którym R oznacza grupę CH_3 .

27. Zastosowanie według zastrz. 15, w którym R oznacza grupę NH_2 .

28. Sposób według zastrz. 15, w którym R oznacza grupę $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$.

29. Sposób według zastrz. 15, w którym sól pirydyniowa jest podawana wraz z innym środkiem sercowo-naczyniowym.

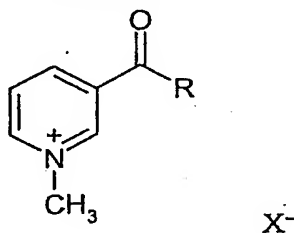
30. Sposób zwiększania poziomu prostacykliny u ssaków, polegający na doustnym podawaniu skutecznej ilości soli pirydyniowej o wzorze I:



I

w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny farmaceutycznie przeciwjon.

10 31. Sole pirydyniowe o wzorze I:

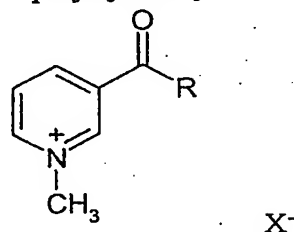


I

w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny do spożycia przeciwjon, do stosowania doustnego w suplementacji diety.

15

32. Zastosowanie soli pirydyniowych o wzorze I:



I

w którym R oznacza grupę NH_2 , CH_3 , lub $\text{N(H)CH}_2\text{OH}$, a X oznacza dopuszczalny do spożycia przeciwjon, do wytwarzania środka przeznaczenia żywieniowego do ochrony naczyń krwionośnych u ssaków w stanach lub chorobach związanych z związanymi z dysfunkcją śródbłonna naczynio-

20

wego, stresem oksydacyjnym i niewydolnością śródbłonkowej syntezy prostacykliny (PGI₂).

33. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym stanem lub chorobą jest miażdżyca tętnic, w szczególności u pacjentów ze stabilną chorobą wieńcową, niedokrwieniami epizodami mózgowymi lub chorobą Buergera.

34. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym stan lub choroba jest wybrany z grupy tzw. czynników rozwoju miażdżycy tętnic (*atherothrombosis*) składającej się z następujących: hipercholesterolemia, nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, hiperhomocysteinemia, oporność na insulinę, cukrzyca, menopauza, podeszły wiek, otyłość, stres psychiczny, infekcje, stany zapalne, w tym choroby przyzębia, reumatoidalne zapalenie stawów, miażdżyca naczyń przeszczepu przy przeszczepie narządów, tolerancja na nitroglicerynę.

35. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym stanem lub chorobą jest zakrzepica o innym podłożu niż miażdżyca tętnic, w szczególności związana z implantacją metalowych i powlekanych protez naczyniowych (stentów), operacją pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG), hemodializa, chorobą zakrzepowo-zatorową żył.

36. Zastosowanie według zastrz. 32, w którym niewydolność śródbłonkowej syntezy prostacykliny jest związana z wiekiem.

36. Zastosowanie według zastrz. 32 do 35, w którym R oznacza grupę CH₃.

37. Zastosowanie według zastrz. 32 do 35, w którym R oznacza grupę NH₂.

38. Zastosowanie według zastrz. 32 do 35, w którym R oznacza grupę N(H)CH₂OH.

Pharmena sp. z o.o.

Pełnomocnik: rzecznik patentowy Jadwiga Sitkowska

Fig. 2. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylnie podanie MNA⁺ (30 mg/kg)

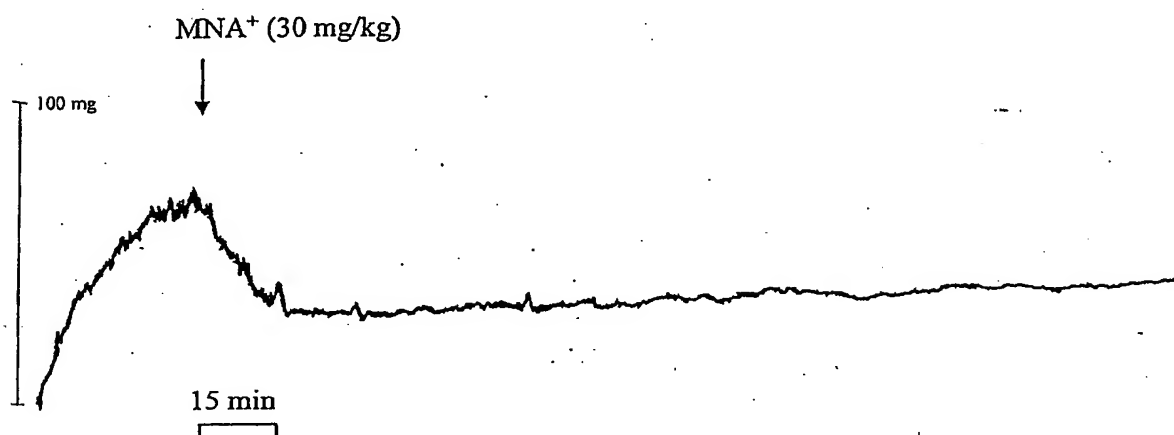
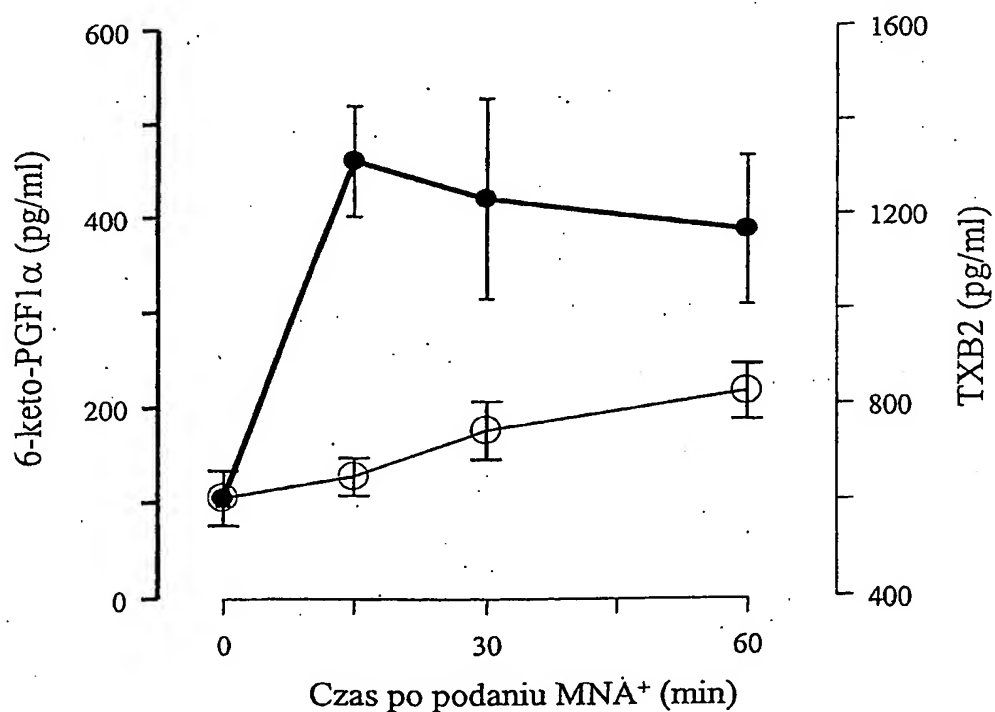
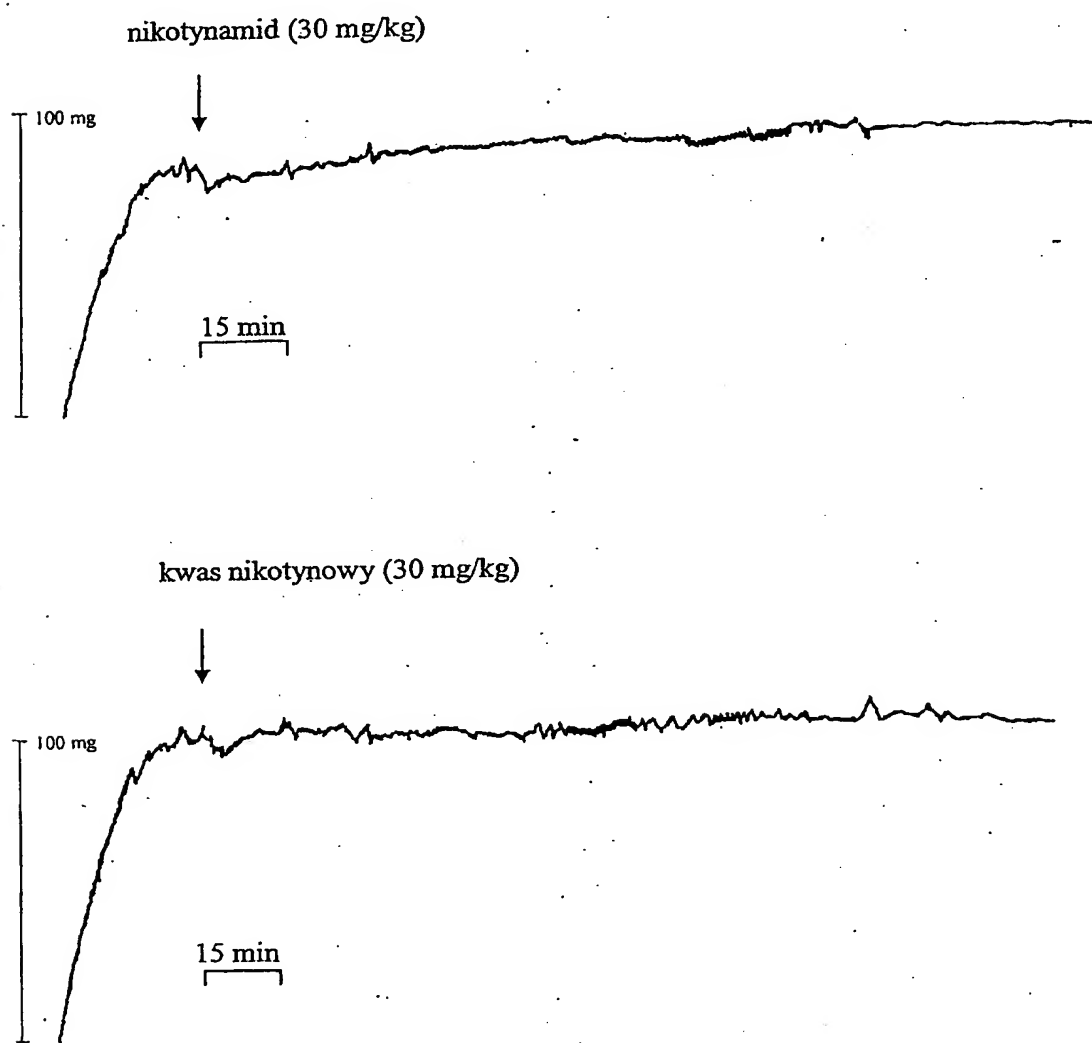


Fig. 3. Zmiany poziomu 6-keto-PGF_{1α} (●) i TXB₂ (○) w osoczu po dożylnym podaniu MNA⁺ (30 mg/kg)



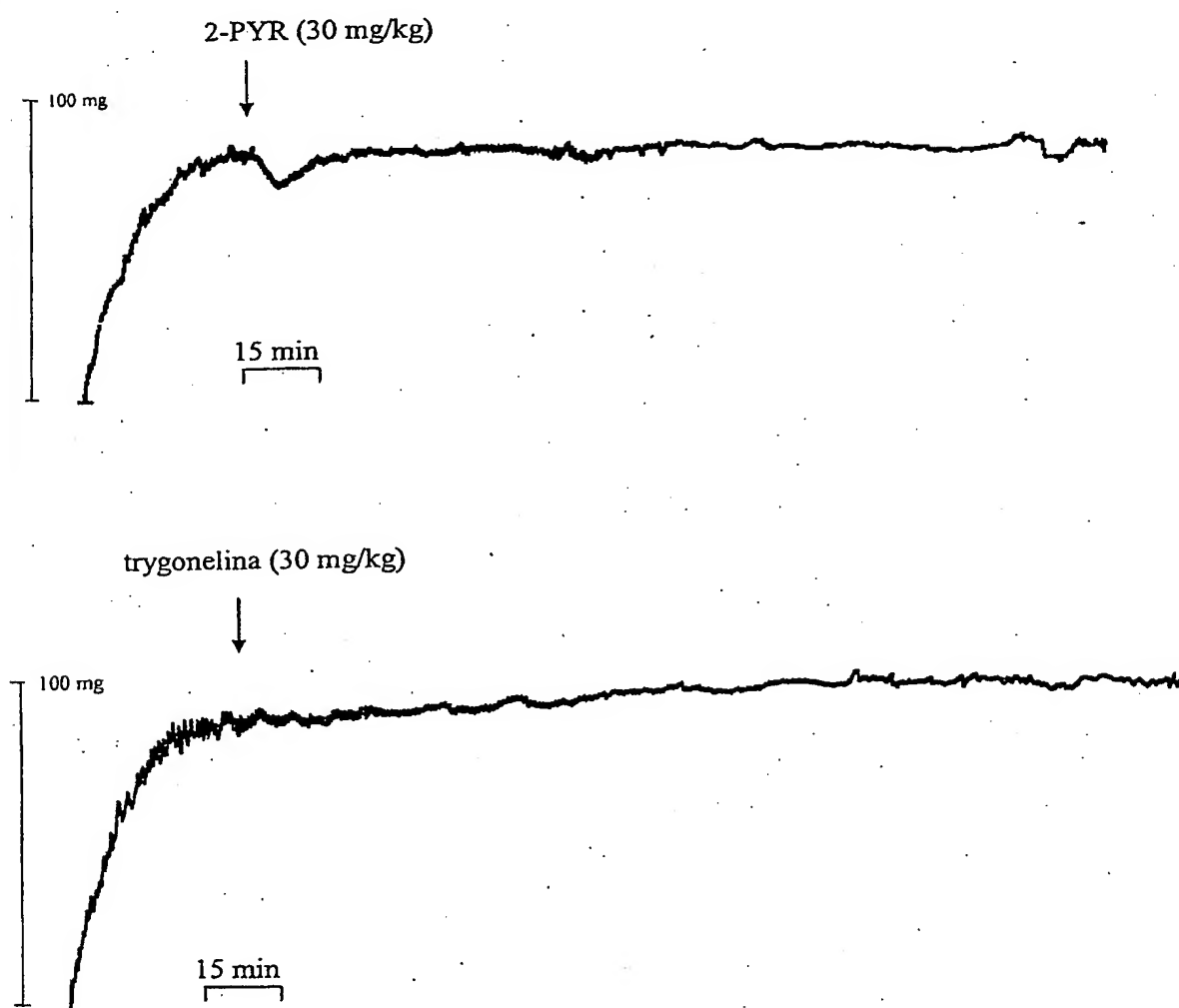
Pracownia Badawcza
Prof. dr hab. Józefina Jankowska

Fig. 4. Brak znaczącej odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* po dożylnym podaniu nikotynamidu (30 mg/kg) lub kwasu nikotynowego (30 mg/kg)



Handwritten signature

Fig. 5. Brak znaczącej odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* po dożylnym podaniu 2-PYR (30 mg/kg) lub trygoneliny (30 mg/kg)



Y. H. Hou

Fig. 6. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylne podanie MAP⁺ (30 mg/kg)

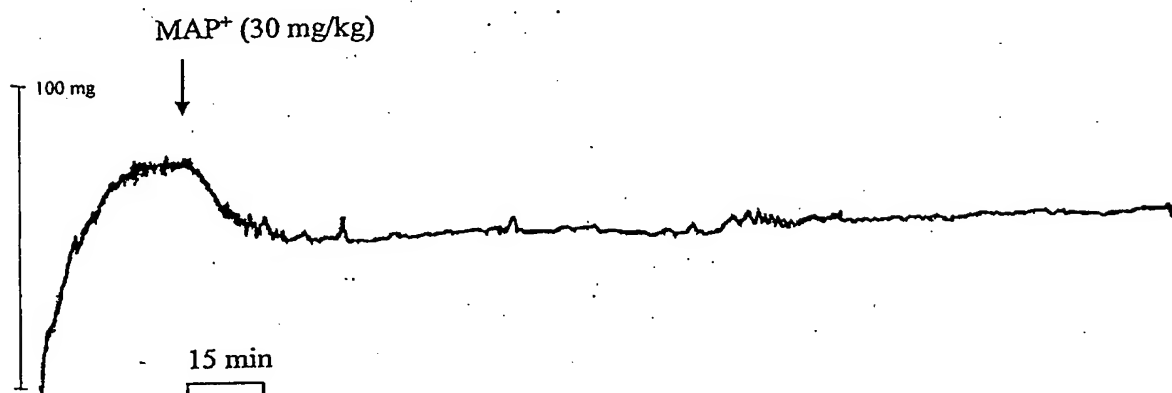
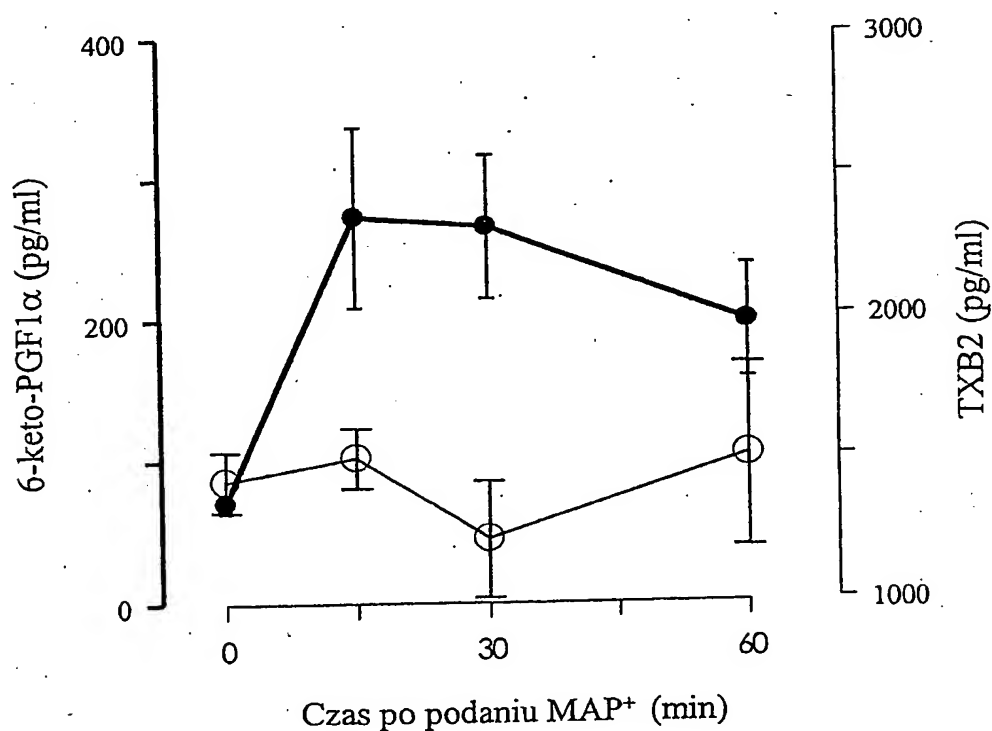


Fig. 7. Zmiany poziomu 6-keto-PGF_{1α} (●) i TXB₂ (○) w osoczu po dożylnym podaniu MAP⁺ (30 mg/kg)

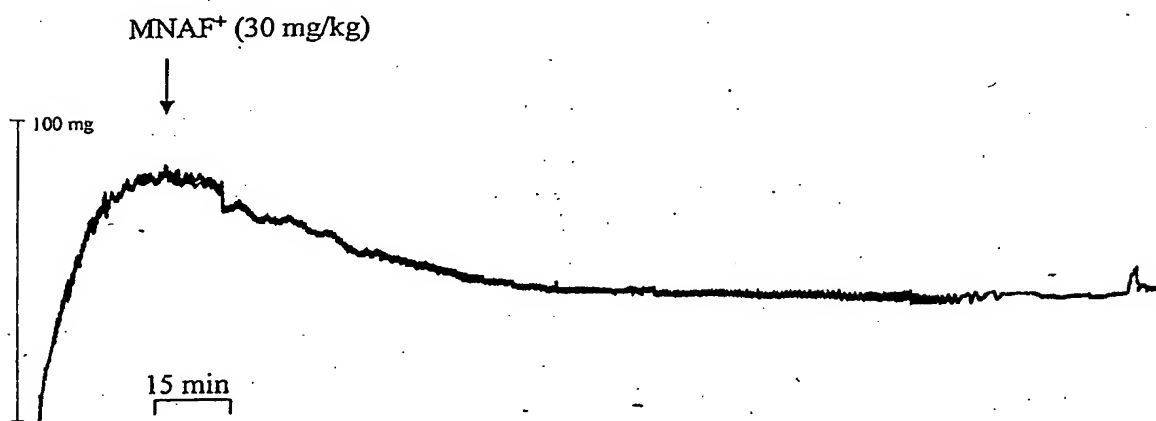


główny

364348

20

Fig. 8. Zapis odpowiedzi trombolitycznej *in vivo* wywołanej przez dożylné podanie MNAF⁺ (30 mg/kg)



Yankowski

Fig. 9. Brak wpływu MNA^+ na agregację płytek krwi wywołaną przez kolagen ($1 \mu\text{g/ml}$)

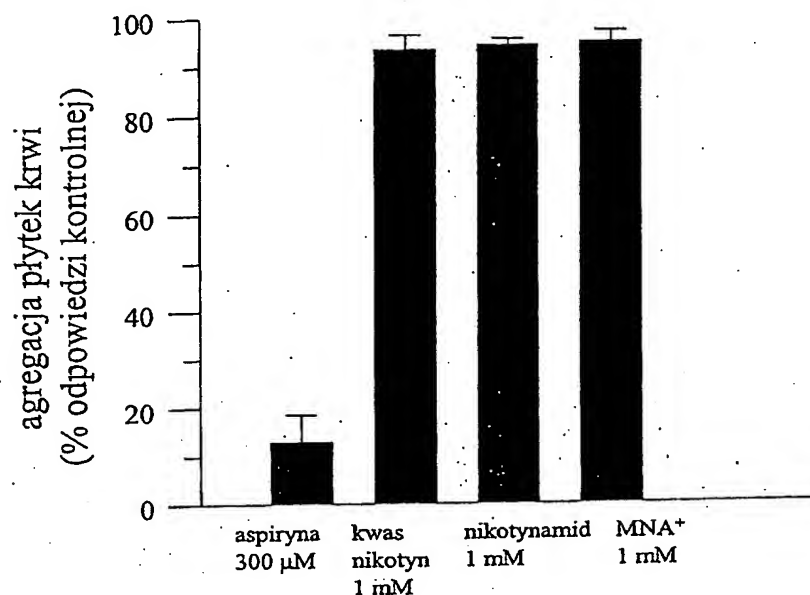
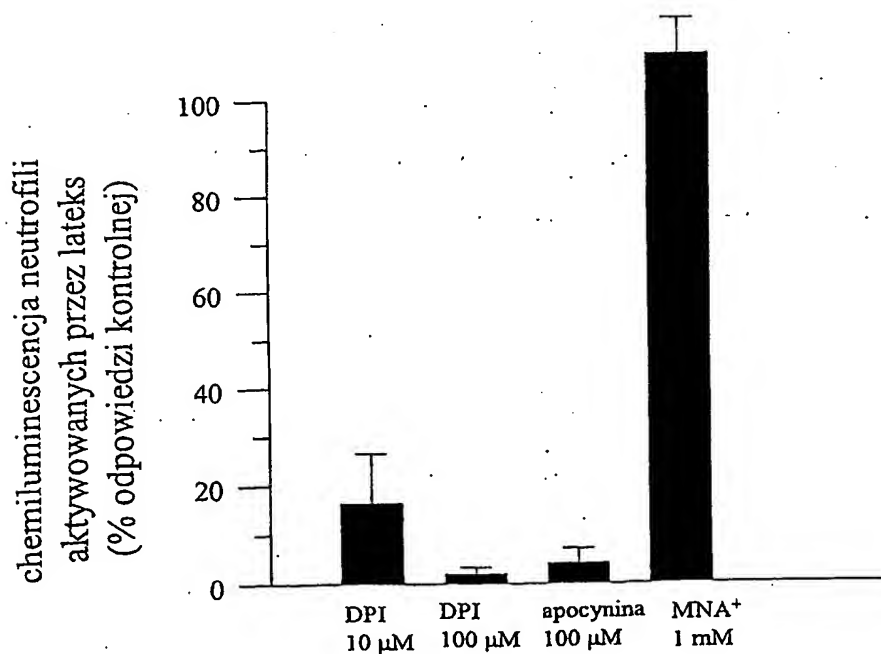


Fig. 10 Brak wpływu MNA^+ na aktywację neutrofilii wywołaną przez lateks



yzkhouse